

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C08B 37/08, C12P 19/26	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/25437 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. August 1996 (22.08.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/00590 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. Februar 1996 (12.02.96) (30) Prioritätsdaten: 195 04 640.4 13. Februar 1995 (13.02.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ABION BETEILIGUNGS- UND VERWALTUNGS- GESELLSCHAFT MBH [DE/DE]; Karl-Heinz-Beckurts- Strasse 13, D-52428 Jülich (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TESLENKO, Alexander [RU/DE]; Eduard-Mörke-Strasse 4 a, D-52249 Eschweiler (DE). (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>
(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING CHITOSAN-GLUCAN COMPLEXES, COMPOUNDS PRODUCIBLE THEREFROM AND THEIR USE (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON CHITOSAN-GLUKAN-KOMPLEXEN, DARAUS HERSTELLBAREN MASSEN UND DEREN VERWENDUNG (57) Abstract A process for producing chitosan-glucan complexes from biological sources by treating the biological sources with solutions in which a) chitin-containing microorganisms as biological sources are treated at least once with a first alkaline solution, b) the product obtained from step a) is then treated with diluted mineral acid, c) this is followed by a further treatment with a second alkaline solution, the alkalinity of which is greater than that of the alkaline solution in step a), until the incomplete deacetylation of the fraction obtained from step b) and d) the solid components are separated, the excess is ejected and the residue is neutralised and washed with water. (57) Zusammenfassung Verfahren zur Herstellung von Chitosan-Glukan-Komplexen aus biologischen Quellen durch Behandlung der biologischen Quellen mit Lösungen, dadurch gekennzeichnet, daß a) als biologische Quellen chitinhaltige Mikroorganismen mindestens einmal mit einer ersten alkalischen Lösung behandelt werden, b) danach das aus Schritt a) erhaltene Produkt mit verdünnter Mineralsäure behandelt wird, c) woraufhin eine weitere Behandlung mit einer zweiten alkalischen Lösung erfolgt, deren Alkalität größer als diejenige der alkalischen Lösung aus Schritt a) ist, zur nicht vollständigen Deacetylierung der aus Schritt b) erhaltenen Fraktion, d) Abtrennen der festen Bestandteile, Verwerfen des Überstandes, Neutralisation und Waschen des Rückstandes mit Wasser.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zur Herstellung von Chitosan-Glukan-Komplexen,
daraus herstellbaren Massen und deren Verwendung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Chitosan-Glukan-Komplexen gemäß Oberbegriff des Anspruchs 1, eine Masse bestehend im wesentlichen aus einem Chitosan-Glukan-Komplex erhältlich durch das erfindungsgemäße Verfahren, daraus geformte Massen, ein Wundheilungsmittel sowie Verwendungen der erfindungsgemäßen Masse.

Zellwände von Mikroorganismen, die Chitin enthalten, werden bereits für viele Anwendung im Stand der Technik eingesetzt. So ist es möglich mit Mikroorganismen Metallionen aus Wasser zu binden und zu akkumulieren. Die sorptive Potenz der Mikroorganismen wird auf die Zellwände zurückgeführt. Insbesondere Zellwände von mikroskopischen Pilzen, Aktinomyzeten und Hefen weisen verschiedene Komplexe von Polysacchariden auf. So besteht beispielsweise bei *Neurospora crassa*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. die innere Schicht der Zellwand aus Chitinmikrofasern, die in einer 1,3-Polyglukanmatrix eingesenkt sind. Die Zellwände bilden eine Schranke gegen viele schädliche Umwelteinflüsse und besitzen eine Schutzfunktion für die entsprechenden Mikroorganismen. So kann der Chitingehalt in Pilzen bis zu 45% der Zellbestandteile (z.

- 2 -

B. beim *Penicillium digitatum*) erreichen. Aus Chitin läßt sich ein wichtiges Aminopolysaccharid, Chitosan, erhalten. Die primären Aminogruppen des Chitosans oder seiner Komplexe können bestimmte Bindungen mit Metallionen selektiv eingehen. Chitosan ist als Sorbens in der Schwermetalleliminierung und als Flockulationsmittel für negativ geladene Kolloide eingesetzt worden. Desweiteren ist es für Polymeren auf Chitinbasis bekannt, daß diese eine Erniedrigung des Cholesteringehaltes bewirken können.

Chitosan könnte eine große Bedeutung für die Anwendung auf vielen Gebieten der Technik erreichen. Bislang ist jedoch kein zufriedenstellendes Verfahren bereitgestellt worden, Chitosanderivate zu erhalten, die beispielsweise in der Medizin, Nahrungsmittelindustrie oder Umwelt- und Entsorgungstechnik eingesetzt werden können. So wird bislang, ausgehend von Myzelien, beispielsweise aus *Rhizopus arhizus*, das entsprechende Myzel mit 4%-iger Natriumdodecylsulfatlösung, einem aggressiven Detergenz, behandelt, mechanisch zerstört, zentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Dadurch ist jedoch eine totale Zerstörung der nativen Zellwandstruktur unvermeidlich. Dies wirkt sich negativ auf das Sorptionsvermögen aus. Es ist desweiteren bekannt, beispielsweise Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* mit denaturierenden Agenzien wie 8 M Harnstofflösung, 1 M Kalilauge und 33 mM Essigsäure-Lösung zu bearbeiten. Hier werden Substanzen erhalten, die nur eine niedrige Sorptionskapazität für Schwermetallionen aufweisen. Diese Methoden sind in *Biotechnol. & Bioeng.*, Vol. 24, N2, Seite 385 - 401, 1982, *The Mechanism of Uranium Biosorption by Rhizopus arhizus*, *The Fungi* Eds. Ainsworth G. C., Sussman A. V., Academic Press 1965, p. 46 - 76 sowie in der GB-2,188,135 A1 beschrieben. GB-2,102,506 betrifft die Gewinnung chitinhaltiger Stoffe aus den Schimmelpilzen *Mucor mucedo* und *Risomucor miecheli*. Dabei wird mit 8%-iger H_2O_2 -Lösung eine Stunde bei 100°C inkubiert und anschließend mit Natriumsilikatlösung behandelt. Es wird eine Masse erhalten, die einen hohen

- 3 -

Protein- und Aschegehalt aufweist. Dies kann sich negativ auf die Flexibilität der entsprechenden Massen auswirken. Die Gewinnung chitinhaltiger Stoffe für den Einsatz in der Wundheilung wird in der US 3,632,575 beschrieben. Dabei erfolgt zunächst eine Chloroformextraktion, eine Behandlung mit 1,0 N Natronlauge, 18 Stunden bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Zugabe niedrig konzentrierter Salzsäure und einer Dialyse mit destilliertem Wasser. Hierbei ist die Chloroformextraktion ein großtechnisch problematischer Schritt, da die Verwendung großer Chloroformmengen aus ökologischen und arbeitsplatzhygienischen Gründen nicht zu empfehlen sind.

Die DE 29 23 802 A1 betrifft ein Verfahren, Myzelien des Schimmelpilzes *Mucor rouxii* mit 40%-iger Natronlauge bei 128°C vier Stunden lang zu behandeln. In ähnlicher Weise werden beispielsweise Myzelien von *Apergillus niger* mit 40%-iger Natronlauge 6 Stunden lang behandelt. Man erhält einen Chitosan-Glukan-Komplex von 32 bis 52% des Gesamtgewichts der Pilzmyzelien, wobei der erhaltene Chitin-Glukankomplex Schwermetallionen, z. B. Kupfer, binden kann. Nachteilig an diesem Verfahren ist jedoch, daß es unmöglich ist, den geforderten Reinheitsgrad betreffend Proteine, Fette und Carbonate in diesem Komplex zu gewährleisten. Ein hoher Carbonatgehalt wirkt sich ebenfalls negativ auf die Flexibilität und Anwendbarkeit der erhaltenen Massen aus. Desweiteren ist nachteilig, daß die native Struktur der Schimmelpilzzellwände vollständig zerstört wird und eine Regulierung des Deacetylierungsgrades von Chitin ebenfalls nicht möglich ist.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht darin, ein Verfahren anzugeben, das zunächst in allgemeiner Form die Nachteile des Standes der Technik vermeidet, also insbesondere in der Lage ist, die Pilzmyzelien so aufzuarbeiten, daß eine möglichst weitgehende Verwendung in unterschiedlichen Bereichen der Technik möglich wird sowie insbesondere den Deacetylierungsgrad zu steuern. Desweiteren

- 4 -

soll das Verfahren umweltmäßig unbedenklich und dabei wirtschaftlich sein.

Überraschenderweise wird das der Erfindung zugrundeliegende Problem gelöst durch ein Verfahren gemäß den Merkmalen des Anspruchs 1. Die Unteransprüche 2 bis 9 betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Chitosan-Glukan-Komplexen geht man von biologischen Quellen aus, die im wesentlichen chitinhaltige Mikroorganismen sind. Diese werden mit Lösungen behandelt, wobei das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß die chitinhaltigen Mikroorganismen mindestens einmal mit einer ersten alkalischen Lösung behandelt werden. Danach wird das aus diesem Schritt erhaltene Produkt mit verdünnter Mineralsäure behandelt. An diesen Schritt schließt sich eine Weiterbehandlung mit einer zweiten alkalischen Lösung an, wobei die Alkalität der zweiten alkalischen Lösung größer ist als diejenige der ersten alkalischen Lösung. Die Alkalität der zweiten alkalischen Lösung ist so eingestellt, daß eine Deacetylierung des aus dem vorhergehenden Schrittes erhaltenen Produktes nicht vollständig erfolgt. Danach schließt sich das Abtrennen der festen Bestandteile aus dieser Behandlungsstufe an gefolgt vom Verwerfen des Überstandes, Neutralisation des Rückstandes und Waschen des Rückstandes mit Wasser.

Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt den Vorteil, das es in schonender Weise die Pilzmyzelien modifiziert, so daß zum einen die native Struktur der Zellwände im wesentlichen erhalten bleibt und der Deacetylierungsgrad steuerbar ist. Dies ist insbesondere von Vorteil zur Einstellung der Eigenschaften der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen erfindungsgemäßen Massen ist, um diese verschiedensten Anwendungsbereichen zuzuführen. So ist zum Beispiel ein höherer Acetylierungsgehalt wünschenswert, wenn die er-

- 5 -

findungsgemäßen Massen, beispielsweise zur Wundheilung eingesetzt werden. Soll jedoch das aus dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliche Produkt beispielsweise als Sorbens eingesetzt werden, kann es vorteilhaft sein, den Deacetylierungsgrad zu erhöhen, um über freie Aminogruppen weitere Komplexierungsstellen bzw. Sorptionsstellen zu erhalten.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorzugsweise chitin-haltige Mikroorganismen, wie Zygomyzeten, Ascomyzeten, Plectomyzeten, Streptomyzeten, Pyrenomyzeten, Discomyzeten und/oder Hefen eingesetzt. Dazu gehören insbesondere *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Phycomyces* sp., *Choanephora* sp., *Zygorrhynchus* sp., *Blakesila* sp., *Actinomyces* sowie *Saccharomyces* sp. Vorzugsweise werden die genannten Mikroorganismen im Stadium ihres höchsten Chitingehaltes und/oder im Endzustand ihrer Anwendung für industrielle Zwecke eingesetzt. Grundsätzlich kommt es jedoch auf den Entwicklungszustand nicht an. Diese Pilze bzw. Hefen zeichnen sich durch einen Chitingehalt in ihrer Zellwand aus.

Erfindungsgemäß wird bevorzugt, daß die Behandlung mit der ersten alkalischen Lösung gemäß Schritt a) des Anspruchs 1 zwei- bis viermal erfolgt.

Die Alkalität der ersten alkalischen Lösung beträgt vorzugsweise 1 bis 15%, insbesondere 5 bis 10%. Die Temperaturen liegen vorzugsweise im Bereich von 50 bis 110°C und insbesondere bei 60 bis 90°C.

Vorzugsweise beträgt die Normalität der zu verwendenden Mineralsäure im Schritt b) des Anspruchs 1 0,5 bis 5. Als Mineralsäure kommen Salzsäure, Salpetersäure, ortho-Phosphorsäure oder Kombinationen davon in Frage. Weniger bevorzugt ist Schwefelsäure, da bei Behandlung mit Schwefelsäure eine Tendenz zur Ausfällung von Sulfaten nicht immer zu verhindern ist.

- 6 -

Vorzugsweise beträgt die Konzentration der zweiten alkalischen Lösung gemäß Schritt c) des Anspruchs 1 10 bis 35%, insbesondere 20 bis 30%. Die Behandlungstemperatur liegt vorzugsweise zwischen 90 und 150°C und die Behandlung dauert vorzugsweise zwischen 30 und 180 min., insbesondere zwischen 60 und 120 min., und besonders bevorzugt zwischen 60 und 90 min. Erfindungsgemäß werden bevorzugt Natronlauge oder Kalilauge eingesetzt. Erfindungsgemäß werden die chitinhaltigen Myzelien der Schimmelpilze also vor ihrer Deacetylierung mit weniger konzentrierter Laugenlösung behandelt, um beispielsweise Pigmente, Fette und Proteine zu eliminieren. Die Demineralisierung erfolgt mit niedrig konzentrierter Mineralsäure, vorzugsweise bei Raumtemperatur. Die so bearbeiteten Pilzmyzelien werden dann mit der zweiten alkalischen Lösung deacetyliert. Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergibt sich, daß nach dem erfindungsgemäßen Verfahren die native Struktur der Zellwände weitestgehend erhalten bleibt. Die erfindungsgemäß geforderte Demineralisation gemäß Schritt b) des Anspruchs 1 entfernt Salze von den Zellwänden, vorzugsweise nach einer Behandlungszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens liegen darin, daß die damit gewinnbaren Chitosan-Glukan-Komplexe nur einer relativ geringen Laugenkonzentration ausgesetzt waren, daß kurze Inkubationszeiten eingehalten werden können, daß Verbesserungen des Reinheitsgrades des Komplexes erzielbar sind, die nativen Strukturen der Zellwand erhalten bleiben. Dadurch lassen sich hocheffektive neue Sorbentien zur Verfügung stellen, die biologisch abbaubar und nicht toxisch sind. Damit eröffnen sich neue Einsatzgebiete dieser Materialien, zum Beispiel in der Medizin, Nahrungsmittelindustrie und dem Umweltschutz.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind mithin durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältliche Massen, die im wesentlichen aus einem Chitosan-Glukan-Komplex bestehen. Im wesent-

- 7 -

lichen bedeutet hier, daß auch noch geringe Mengen anderer Substanzen, insbesondere Chitin oder mit Acetylgruppen oder Restmineralien, in dem Material enthalten sein können. Der Reinheitsgrad ist jedoch sehr hoch.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen erfindungsgemäßen Massen zeichnen sich insbesondere dadurch aus, daß die Struktur der Zellwand der Mikroorganismen, aus der die Massen stammen, noch weitestgehend intakt sind. Der Ascheanteil dieser Materialien liegt unter 10%. Dies ist ebenfalls eine Angabe, die den Begriff "im wesentlichen" für den Fachmann hinreichend erläutert.

Die erfindungsgemäßen Massen lassen sich in ihrem Deacetylierungsgrad mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens beeinflussen. So kann durch eine Erhöhung der Expositionszeit des Myzels mit Erhöhung der zweiten alkalischen Lösung eine erhöhte Deacetylierung erzielt werden, wohingegen die Behandlung mit geringerer Laugenkonzentration oder bei niedrigerer Temperatur innerhalb kürzerer Zeit ein geringerer Deacetylierungsgrad einstellbar wird.

Aus den erfindungsgemäßen Massen lassen sich geformte Massen herstellen, indem beispielsweise eine Suspension der erfindungsgemäßen Masse einer Gefriertrocknung unterzogen wird. Die geformten Massen können insbesondere in Form von porösen Filmen, wie Membranen, Matten, Pflastern, Vliesen, insbesondere in Form sogenannter Non-Woven-Textilien, oder Fäden vorliegen. Die geformten Massen können auch aus einer ersten Masse, die aus der erfindungsgemäßen Masse besteht, und einer zweiten Zellulose enthaltenden Masse geformt sein. Insbesondere können solche geformten Massen in Form einer Folie oder einer blattartigen Struktur vorliegen. Aus den geformten oder den ungeformten Massen gemäß der Erfindung lassen sich insbesondere Wundheilungsmittel herstellen, vorzugsweise in Folien- oder Streifenform. Diese können dann als Pflaster auf eine Wunde aufgelegt, die Heilung dieser Wunde be-

schleunigen. Wird die erfindungsgemäße Masse in Fäden geformt, können diese als chirurgische Wundnahtmaterialien eingesetzt werden.

Als weitere Anwendungsgebiete kommen die erfindungsgemäßen Massen als Enterosorbentien in Frage. Darunter sind Sorbentien zu verstehen, die aus Körperflüssigkeiten, wie Blutserum, oder im Magen Substanzen zu binden vermögen. Dazu gehören beispielsweise Cholesterin oder andere Stoffe, die z. B. in pathologischen Fällen in erhöhter Konzentration auftreten. Ebenso lassen sich andere Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Urin mit diesen Sorbentien reinigen. Es können aufgrund der sorptiven Potenz insbesondere Bakterien und Toxine, unerwünschte Enzyme etc. gebunden werden. Auf der sorptiven Potenz der erfindungsgemäßen Massen beruht auch der Anwendungsbereich als Wundabdeckung, wodurch beispielsweise eine Gewebeentwässerung erfolgt. Vorteilhaft wirkt sich hierbei insbesondere die Einwirkung hydrolysierender Enzyme, wie Lysozym, auf die erfindungsgemäßen Massen aus. Dabei entstehen Oligosaccharide, die eine Heilwirkung aufweisen können, wie beispielsweise Oligomere aus oder mit N-Acetyl-Glukanamin. In solchen Fällen kann es also sinnvoll sein, den Deacetylierungsgrad möglichst gering zu halten, um eine hohe Freisetzung der gewünschten Oligosaccharide zu gewährleisten. Aufgrund des sorptiven Charakters kann die erfindungsgemäße Masse bakteriostatisch oder gar bakterizid wirken, indem Bakterien adsorbiert werden. Dies ist insbesondere vorteilhaft bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Massen als Wundabdeckung oder Enterosorbens. Die letztgenannte Eigenschaft qualifiziert die erfindungsgemäßen Massen jedoch auch als Stabilisator für Nahrungsmittel, insbesondere Emulsionen.

Die erfindungsgemäßen Massen sind in geformter Form, beispielsweise als Membranen oder Presskörper, wie auch in Schüttungen zur Entfernung und/oder Rückgewinnung von Substanzen, insbesondere aus Lösungen geeignet. Als zu

- 9 -

sorbierende Substanzen kommen sowohl organische wie auch anorganische Substanzen in Frage. So können beispielsweise Schwermetalle aus wäßrigen Lösungen entfernt werden, so daß die erfindungsgemäßen Massen im Umweltschutz eingesetzt werden können. Es lassen sich ebenfalls organische Substanzen, insbesondere Pestizide, Herbizide und andere organische Schadstoffe aus Lösungen entfernen. Auch in diesem Anwendungsbereich können die erfindungsgemäßen Massen im Umweltschutz zur Geltung kommen.

Eine weitere interessante Anwendung besteht in der Verwendung als Chromatographiehilfe zur Trennung oder Immobilisierung von Biopolymeren, wie Enzymen, Antikörpern und Katalysatoren. So zeigen Adsorptionsdaten von Übergangsmetallionen, daß diese auch mit dem Komplex von Alkali- und Erdalkalielementen getrennt werden können. Wird Lysozym beispielsweise an dem Chitosan-Glukan-Komplex chromatographisch in einer Säule getrennt, so behält es 70% seiner Aktivität.

Desweiteren kommen noch andere Anwendungen der erfindungsgemäßen Massen in Frage, so beispielsweise zur Herstellung von Produkten und Zubereitungen, wie Leimen, Klebemitteln, Flockungsmitteln, Koagulationshilfen, Substraten für Enzyme, Adsorptionsmittel für chromatographische Zwecke, Fertigungsmittel, Zusätze zu Papier, Hilfsstoffe und Zusätze für Textilien, für Glaswolle, für Kunststoffe, für Farbstoffe für natürliche und künstliche Häute, für pharmazeutische Kapseln, zur Zellaggregation, für mikrobiologische Medien, für Kulturmedien sowie Nahrungsmittel für Menschen und Tiere in Frage.

Durch den guten Reinheitsgrad der hergestellten Chitin-Chitosan-Glukan-Komplexe, d. h. den niedrigen Gehalt an Protein und Melanin und den niedrigen Gehalt an Mineralien, vor allem Carbonaten (Ascheanteil) und den hohen und/oder einstellbaren Deacetylierungsgrad und durch die weitgehende Erhaltung der Zellwandstruktur lassen sich definierte

- 10 -

Produkte mit definierten Eigenschaften erhalten. Die herausragende Eigenschaft ist insbesondere die hohe Sorptionskapazität (siehe Tabelle 4), die durch alle drei Behandlungsschritte positiv beeinflußt wird, für viele Stoffe aus Lösungen, wie biologischen Flüssigkeiten (Blut, Serum), Abwässern usw. zur Entfernung, Lagerung und/oder Wiederverwertung. Außerdem ist das Produkt nicht toxisch und biologisch abbaubar.

Zu den in der Praxis relevanten Verwendungen gehört die Sorptionsfähigkeit insbesondere für Schwermetalle, inklusive Uran und anderen Radionukliden, sowie die für Bakterien und deren Toxine und Metaboliten, Proteine und Fette und andere organische und biologische Verbindungen, wie Cholesterol, Harnstoff, Pestizide, Dioxin, Farbstoffe, Aldehyde, Säuren usw.

Für verschiedene Verwendungen kann der Chitin-Chitosan-Glukan-Komplex mit erhaltener Zellwandstruktur nicht nur als Pulver oder Granulat, sondern auch leicht in anderen Formen wie Film, Folie, Membran (selbsttragend), Papier, "Löschpapier" (insbesondere im Komposit mit Cellulose), schwammartige oder gewebeartige Struktur (durch Gefriertrocknung, z. B. Pflaster) hergestellt werden. Weitere Anwendungen sind als Flockungsmittel für Polyelektrolyte und Kolloide sowie als Stabilisatoren für Emulsionen.

In der Medizin ergeben sich mehrere Anwendungsmöglichkeiten des Produktes aufgrund seiner Eigenschaften. Aus der hohen Sorptionskapazität für unerwünschte Stoffe und der Ungiftigkeit, die sich im Tierversuch erwiesen hat, ergibt sich die Anwendung als Enterosorbens für die Reinigung des Magen-Darm-Traktes oder des Bluts sowie die Senkung der Konzentration bestimmter Stoffe im Blut, wie Cholesterol.

Die gewebeartige Struktur erlaubt die Herstellung von elastischen hochporösen, d. h. gut luftdurchlässigen

- 11 -

Pflastern für die Wundabdeckung. Es lassen sich sichtbare Poren erzeugen. Die Porosität läßt sich durch Begasung während der Gefriertrocknung einstellen. Durch Zusatz gewünschter Stoffe kann das Pflaster als Depot für diese dienen. Der Abbau von Chitin-Chitosan-Strukturen durch Hydrolyse (z. B. mit Lysozym) setzt direkt auf dem Pflaster Oligosaccharide enthaltend N-Glukosamin- und N-Acetylglucosamineinheiten frei, die an der Geweberegeneration teilnehmen und die Wundheilung beschleunigen. Die Zellproliferation wird aktiviert, die Epithelbildung stimuliert und die Bildung von Kollagenphasen verringert (Heilung großer Wunden ohne Narben). Durch die Sorption von Bakterien wirkt das Pflaster "bakterizid". Positiv wirkt auch die Sorption von Entzündungsmediatoren und proteolytischen Enzymen.

Die hohe Wasseraufnahmekapazität (bei der Trocknung verliert das Produkt im Verhältnis zum Trockengewicht 500% an Wasser) kann das Material zur Gewebeentwässerung und Wunddrainage eingesetzt werden.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung eines Chitosan-Glukan-Komplexes aus *A.niger* aus Abfall der Zitronensäureproduktion.

1. Entfernung von Protein u.ä.: Zu 150 g Myzelien (Feuchtwicht) von *A. niger* in einem chemischen Reaktor von 2 l Gesamtvolumen wurden 1,5 l 8%-ige Natronlauge zugefügt. Die erhaltene Dispersion wurde 60 min. bei 90°C gerührt (60 rpm). Danach wurde der Inhalt durch einen Gewebefilter filtriert. Der Filterkuchen wurde noch einmal mit 1,5 l 8%-iger Natronlauge 60 min. bei 90°C gerührt. Das erhaltene Produkt wurde filtriert und dreimal mit Wasser im 20fachen Überschuß gewaschen.

- 12 -

2. Entfernung von Mineralien (vor allem Carbonat): Das Produkt wurde im Reaktor mit 1,5 l 2N Salzsäure 120 - 180 Minuten bei Raumtemperatur behandelt, anschließend filtriert und mit destilliertem Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Es wurden 90 - 95 g (Feuchtgewicht) Chitin-Glukan-Komplex aus *A. niger*-Myzelien (oder 18 - 19 g Trockengewicht) erhalten.

3. Deacetylierung: Das Produkt aus 2. wurde in einem Reaktor mit 1,0 l 29%-iger Natronlauge 90 Minuten bei 125°C gerührt. Danach wurde die Masse über Glasgewebe filtriert. Zu dem Filterkuchen wurden in einem Reaktor unter Rühren 4 l destilliertes Wasser zugefügt. Zu der erhaltenen Dispersion wurde im Laufe von 180 - 240 Minuten kontinuierlich 4%-ige Salzsäure gegeben, bis ein pH-Wert von 6,5 - 7,0 erreicht ist. Das neutralisierte Produkt wurde filtriert und mit destilliertem im 10fachen Überschuß gewaschen.

Es wurden 65 g (Feuchtgewicht) Chitin-Chitosan-Glukan-Komplex aus *A. niger*-Myzelien (oder 17 g Trockengewicht) erhalten. Das Produkt war farblos. Insbesondere in der Dispersion war zu sehen, daß die Zellwände erhalten geblieben waren, was durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt wurde. Der Deacetylierungsgrad bezogen auf das Chitin im Chitin-Glukan-Komplex war 89%.

Beispiele 2 - 11

Herstellung von Chitosan-Glukan-Komplexen aus *A. niger* aus Abfall der Zitronensäureproduktion.

Grundsätzlich wie Beispiel 1. Tabelle 1 gibt die unterschiedlichen Bedingungen an.

Beispiel 10 wurde nach DE-A-29 23 802 hergestellt ("Prototyp").

- 13 -

Beispiel 11 zeigt eine Herstellung in pilottechnischem Maßstab entsprechend Nr. 1: 6 kg Myzelien mit 60 l 8%-ige Natronlauge im ersten Schritt und 60 l 2 N Salzsäure im zweiten Schritt ergeben 4,9 kg Chitin-Glukan-Komplex, daraus werden mit 50 l 29%-iger Natronlauge 4,5 kg (Feuchtgewicht) Chitin-Glukan-Komplex entsprechend 0,8 kg Trockengewicht.

Entsprechend den Beispielen 1 - 9 wurden auch Chitin-Chitosan-Glukan-Komplexe aus Myzelien von *P. chrysogenum* (Nr. 12 - 20), *Blakeslia trispora* (Nr. 21 - 29) und *Streptomyces* sp. (Nr. 30 - 38) hergestellt.

Tabelle 2 zeigt die Wirkung der Proteinentfernung und der Demineralisierung (Carbonatentfernung). Der Proteingehalt im Chitin-Glukan-Komplex wurde mit dem Folin-Reagenz bei 750 nm (niedriger Konzentrationsbereich) und 500 nm (hoher Konzentrationsbereich) bestimmt. Der Proteingehalt wurde aus einer Eichgeraden mit Rinderserumalbumin-Standards nach R.M.C. Dawson et al., "Data for Biochemical Research", Clarendon Press, Oxford 1986, Seite 550, bestimmt, der Melaningehalt spektrophotometrisch nach A. Malama, "Biologisch aktive Stoffe aus Mikroorganismen", in Nauka i Technika, Minsk, 1975, Seiten 120 - 126.

Tabelle 3 zeigt die Wirkung der Deacetylierung. Der Deacetylierungsgrad wurde mit UV-Spektroskopie nach R.A.A. Muzzarelli, G. Rochette, "Determination of the Degree of Deacetylation of Chitin by First Derivative UV-Spectrometry", in Carbohydr. Res. 1985, 5, Seiten 461 - 472 bestimmt. Die angegebene Kationaustauschkapazität bezieht sich auf das Gleichgewicht. Die Nr. 10 ist der "Prototyp" nach DE 29 23 802.

Aus den Daten ist zu erkennen, daß der Deacetylierungsgrad mit der Reaktionsdauer zunimmt, daß aber auch bei zu hohen Reaktionszeiten (in Abhängigkeit von der Laugenkonzentration und Temperatur) die Zerstörung der Zellwände zunimmt. Mit

der Reaktionsdauer nimmt auch der Anteil der wasserlöslichen Fraktion des Chitin-Chitosan-Glukan-Komplexes zu. Die chemischen Verschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum der löslichen Fraktion und die Titration der Aminogruppen zeigen, daß es sich um Chitosan handelt.

Tabelle 4 zeigt die Gleichgewichts-Sorptionskapazitäten für Schwermetallkationen, die Farbstoffe Aktiv Rot und Aktiv Blau sowie das Protein Rinderserumalbumin. Die Sorptionsexperimente wurden mit 0,1 g Chitosan-Glukan-Komplex in 50 ml durchgeführt, wobei Schwermetallkationen in Konzentrationen von 52 mg/ml eingesetzt wurden (als Salze wurden verwendet: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Hg}(\text{Ac})_2$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ und CuSO_4), die Farbstoffmenge betrug etwa 70 mg/ml und die Proteinmenge etwa 10 mg/ml. Die Werte liegen deutlich über denen, die in der DE 29 23 802 für den dort hergestellten Chitosan-Glukan-Komplex (10*, Tabelle 4) genannt wurden, die denen entsprechen, die für den nach den dortigen Angaben hergestellten Prototyp Nr. 10 gefunden wurden.

Außerdem ist für zwei Komplexe die prozentuale Abnahme der Cholesterinkonzentration aus 50 ml Lösungen mit 100 mg/l und 0,1 g Chitosan-Glukan-Komplex angegeben.

Bedingungen bei der Herstellung verschiedener Chitosan-Glukan-Komplexe aus Myzelien von <i>A. niger</i>													
Nr	1. Proteinentfernung				2. Demineralisierung			3. Deacetylierung				Bemerkungen	
	% NaOH	Zeit (min)	Temp. °C		Säure	Zeit (min)	Temp. °C	% NaOH	Zeit (min)	Temp. °C	Ausb. g (trock.)		Deacetyl. %
1	8	60	90	2x	2 N HCl	120 - 180	20	29	90	125	17	89	
2	8	60	60	4x	2 N HCl	120 - 180	20	29	90	125	18	83	
3	8	60	75	4x	2 N HCl	120 - 180	20	29	90	125	17,5	85	
4	8	60	90	4x	3% H ₃ PO ₄	120 - 180	20	29	90	125	16	89	
5	8	60	90	2x	3% HNO ₃	120 - 180	20	29	90	125	16,5	89	
6	8	60	90	2x	2 N HCl	120 - 180	20	29	60	125	18,5	60	
7	8	60	90	2x	2 N HCl	120 - 180	20	29	30	125	20	37	
8	8	60	90	2x	2 N HCl	120 - 180	20	29	240	125	14	89	Myzel z. T. zerstört
9	8	60	90	2x	2 N HCl	120 - 180	20	20	90	125	19	60	
10	8	60	90	2x	-	-	-	40	360	128	50*	80	Prototyp Myzel zerstört

11	8	60	90	1x	2 N HCl	120	20	29	90	125	800	80	techni- sche Menge
----	---	----	----	----	---------	-----	----	----	----	-----	-----	----	--------------------------

* wegen hohem Aschegehalt

Tabelle 2 Proteingehalt und Mineralgehalt nach den Schritten 1 und 2 (Myzelien von A. niger)						
Nr .	1. Proteinentfernung			Protein	Melanin	Asche
	Zeit (min)	Temp. °C		%	%	%
2*	60	60	2x	6,0	2,1	30,0
2	60	60	4x	Spuren	Spuren	28,0
2	+ Demineralisierung			Spuren	Spuren	3,0
3*	60	75	2x	6,0	4,0	30,0
3	60	75	4x	Spuren	Spuren	27,0
3	+ Demineralisierung			Spuren	Spuren	8,0
1	60	90	2x	Spuren	Spuren	18,0
1	+ Demineralisierung			Spuren	Spuren	3,0

Tabelle 3 Wirkung der Deacetylierung (Myzelien von A. Niger und P. chrysogenum)							
Nr.	% NaOH	Zeit (min)	Temp. °C	Aussehen	Kationenaustauschkapazität (mg H(+)/g)	Deacetylierungsgrad %	Löslichkeit in HCl, %
1	29	90	125	natives Myzel	1,0	89,0	10,0
6	29	60	125	natives Myzel	0,6	60,0	8,0
7	29	30	125	natives Myzel	0,4	37,0	2,0
8	29	240	125	teilweise zerstörtes Myzel	1,0	89,0	11,0
9	20	120	125	natives Myzel	0,6	60,0	2,0
10	40	360	128	total zerstörtes Myzel	0,8	80,0	15,0
12	29	90	125	natives Myzel	1,0	89,0	10,0
13	29	60	125	natives Myzel	0,8	61,0	5,0
14	29	30	125	natives Myzel	0,4	37,0	2,0

Tabelle 4 Sorptionskapazitäten der Produkte aus A. niger, P. chrysogenum, B. trispora und Streptomyces sp.									
mg/g getrocknetes Produkt									
Nr.	Cu (2+)	Hg (2+)	Pb (2+)	Cr (6+)	Farbstoff	Protein	% Abnahme Cholesterin		
1	240	180	160	30	29	1000	75		
12	230	168	156	35	25	1000	90		
21	200	101	98	28	29	700			
30	180	98	90	30	18	800			
10*	25								
10	20		10		5	100,0			

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung von Chitosan-Glukan-Komplexen aus biologischen Quellen durch Behandlung der biologischen Quellen mit Lösungen, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) als biologische Quellen chitinhaltige Mikroorganismen mindestens einmal mit einer ersten alkalischen Lösung behandelt werden,
 - b) danach das aus Schritt a)erhaltene Produkt mit verdünnter Mineralsäure behandelt wird,
 - c) woraufhin eine weitere Behandlung mit einer zweiten alkalischen Lösung erfolgt, deren Alkalität größer als diejenige der alkalischen Lösung aus Schritt a) ist, zur nicht vollständigen Deacetylierung der aus Schritt b) erhaltenen Fraktion,
 - d) Abtrennen der festen Bestandteile, Verwerfen des Überstandes, Neutralisation und Waschen des Rückstandes mit Wasser.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die chitinhaltigen Mikroorganismen Zygomyzeten, Ascomyzeten, Plectomyzeten, Streptomyzeten, Pyrenomyzeten, Discomyzeten und/oder Hefen sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung mit alkalischer Lösung gemäß Schritt a) des Anspruch 1 zwei- bis viermal erfolgt.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung mit der ersten alkalischen Lösung bei einer Temperatur von 50 bis 110°C durchgeführt wird mit einer 1 bis 15%-igen

- 21 -

alkalischen Lösung, insbesondere 5 bis 10%-igen alkalischen Lösung.

5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Normalität der Mineralsäure 0,5 - 5 ist.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Mineralsäure Salzsäure, Salpetersäure, ortho-Phosphorsäure oder Kombinationen davon eingesetzt werden.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der zweiten alkalischen Lösung 10 - 35 %, insbesondere 20 bis 30 % beträgt.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als alkalische Lösung eine wäßrige Lösung von Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid verwendet wird.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur im Schritt c) zwischen 90 und 150 °C liegt und die Behandlung zwischen 30 und 180 min, insbesondere zwischen 60 und 120 min dauert.
10. Masse bestehend im wesentlichen aus einem Chitosan-Glukan-Komplex erhältlich durch ein Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Masse nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Masse die Struktur der Zellwand der Mikroorganismen, aus der die Masse stammt, aufweist.

- 22 -

12. Masse nach Anspruch 10 und/oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Masse einen Ascheanteil unter 10% aufweist.
13. Geformte Masse erhältlich durch Gefriertrocknung einer Suspension der Masse nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12.
14. Geformte Masse nach Anspruch 13, in Form von porösen Filmen, Matten, Pflastern, Vliesen, insbesondere in Form sogenannter Non-woven Textilien.
15. Geformte Masse enthaltend neben einer ersten Masse gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, eine zweite Masse, wie Zellulose, insbesondere in Form einer Folie oder eines Blattes.
16. Wundheilungsmittel im wesentlichen bestehend aus einer Masse nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12 und oder einer geformten Masse nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 15 in Blatt- oder Streifenform.
17. Verwendung einer Masse nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12 als Sorptionsmaterial zur Entfernung und/oder Rückgewinnung von Substanzen, insbesondere von Schwermetallen aus Lösungen.
18. Verwendung einer Masse nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12 als Sorptionsmaterial zur Entfernung und/oder Rückgewinnung von organischen Substanzen, insbesondere Pestiziden, Herbiziden und anderen organischen Schadstoffen aus Lösungen, insbesondere biologischen Lösungen.
19. Verwendung nach Anspruch 18 als Enterosorbens in vivo.

- 23 -

20. Verwendung einer Masse nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12 und/oder einer geformten Masse nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 15 als Wundheilungsmittel.
21. Verwendung einer Masse nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12 und/oder einer geformten Masse nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 15 als Träger für Wirkstoffe zur allmählichen Abgabe der Wirkstoffe.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 96/00590

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C08B37/08 C12P19/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C08B C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB,A,2 259 709 (BRITISH TEXTILE TECHNOLOGY GROUP) 24 March 1993 see page 2, paragraph 3 ---	1-21
P,X	DATABASE WPI Week 9622 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 220373 XP002005551 & RU,A,2 043 995 (FOOD AROMAS ACIDS DYES RES INST) , 20 September 1995 see abstract ---	1-21
A	GB,A,2 026 516 (RICCARDO MUZZARELLI) 6 February 1980 cited in the application ---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 1996

Date of mailing of the international search report

1 1. 07. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Lensen, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/00590

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,90 14071 (RHONE-POULENC CHEMICALS LIM.) 29 November 1990 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/00590

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB-A-2259709	24-03-93	NONE	

GB-A-2026516	06-02-80	BE-A- 876990	14-12-79
		DE-A- 2923802	20-12-79
		FR-A,B 2432046	22-02-80
		JP-A- 55009691	23-01-80
		NL-A- 7904674	18-12-79
		US-A- 4282351	04-08-81
		US-A- 4368322	11-01-83

WO-A-9014071	29-11-90	AU-B- 5653790	18-12-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In tionales Aktenzeichen

PCT/EP 96/00590

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C08B37/08 C12P19/26

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C08B C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GB,A,2 259 709 (BRITISH TEXTILE TECHNOLOGY GROUP) 24.März 1993 siehe Seite 2, Absatz 3 ---	1-21
P,X	DATABASE WPI Week 9622 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 220373 XP002005551 & RU,A,2 043 995 (FOOD AROMAS ACIDS DYES RES INST) , 20.September 1995 siehe Zusammenfassung ---	1-21
A	GB,A,2 026 516 (RICCARDO MUZZARELLI) 6.Februar 1980 in der Anmeldung erwähnt --- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13.Juni 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

1 1. 07. 96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lensen, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/00590

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,90 14071 (RHONE-POULENC CHEMICALS LIM.) 29.November 1990 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/00590

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB-A-2259709	24-03-93	KEINE	

GB-A-2026516	06-02-80	BE-A- 876990	14-12-79
		DE-A- 2923802	20-12-79
		FR-A,B 2432046	22-02-80
		JP-A- 55009691	23-01-80
		NL-A- 7904674	18-12-79
		US-A- 4282351	04-08-81
		US-A- 4368322	11-01-83

WO-A-9014071	29-11-90	AU-B- 5653790	18-12-90
